

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

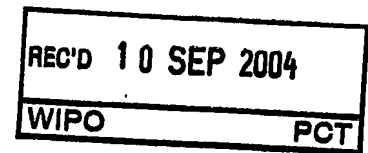
26.07.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 7月31日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-283427
[ST. 10/C]: [JP2003-283427]



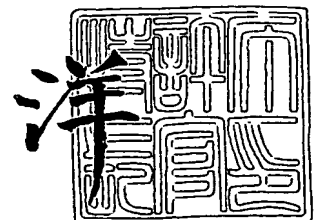
出 願 人
Applicant(s): 財団法人名古屋産業科学研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PTL11
【提出日】 平成15年 7月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
C12N 5/10

【発明者】
【住所又は居所】 福岡県久留米市中央町 2 9 - 1 5 ライオンズマンション中央町
1 0 0 4 号
【氏名】 小財 健一郎

【発明者】
【住所又は居所】 福岡県久留米市篠山町 1 7 6 - 1 三嶋ビル 4 0 6 号
【氏名】 永野 聡

【特許出願人】
【識別番号】 598091860
【氏名又は名称】 財団法人名古屋産業科学研究所

【代理人】
【識別番号】 100109597
【弁理士】
【氏名又は名称】 西尾 章

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 069443
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

上流から順に E 1 A 領域と、E 1 B 領域の少なくとも 1 の蛋白質コーディング領域又は全 E 1 B 領域と、ポリ A シグナル配列と、リコンビナーゼ認識配列とを有し、前記 E 1 A 領域の内因性プロモーターと E 1 B 領域の少なくとも 1 の蛋白質コーディング領域における蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節する内因性プロモーターとをそれぞれ欠失させ、これらの欠失箇所それぞれ制限酵素認識配列を挿入して作製した増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの前記制限酵素認識配列に、標的組織で特異的に発現するプロモーターを各々導入して増殖制御型ベクタープラスミドを作製し、さらに、この増殖制御型ベクタープラスミドを E 1 領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドに組み込み、増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製することを特徴とする増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 2】

E 1 A 領域が R b 蛋白結合配列を欠失しているものである請求項 1 に記載の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 3】

E 1 B 領域の蛋白質コーディング領域が 19 K D a 蛋白質コーディング領域及び／又は 55 K D a 蛋白質コーディング領域である請求項 1 又は請求項 2 に記載の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 4】

E 1 A 領域の内因性プロモーターと E 1 B 領域の少なくとも 1 の蛋白質コーディング領域における蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節する内因性プロモーターの欠失箇所に挿入される制限酵素認識配列に、平滑末端となる制限酵素サイトがそれぞれ含まれる請求項 1 ～請求項 3 のいずれかに記載の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 5】

リコンビナーゼ認識配列が LoxP 又は LoxH などその変異体配列である請求項 1 ～請求項 4 のいずれかに記載の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 6】

請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の増殖制御型ベクタープラスミドと、上流から順にリコンビナーゼ認識配列と制限酵素認識配列を各々挿入して作製した治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの前記制限酵素認識配列に、恒常的強発現プロモーター又は治療遺伝子の発現プロモーターのいずれかと治療遺伝子を上流から順に導入して作製した第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドとに、リコンビナーゼを作用させて第 2 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを作製し、さらに、この第 2 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを E 1 領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドに組み込み、治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製することを特徴とする治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 7】

請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと、上流から順にリコンビナーゼ認識配列と制限酵素認識配列を各々挿入して作製した治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの前記制限酵素認識配列に、恒常的強発現プロモーター又は治療遺伝子の発現プロモーターのいずれかと治療遺伝子を上流から順に導入して作製された第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドとに、リコンビナーゼを作用させ、治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製することを特徴とする治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 8】

増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラス

ミドを混合してリコンビナーゼを作用させ、その後、両者を形質転換することを特徴とする請求項 7 に記載の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 9】

増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドをリコンビナーゼを発現する細胞にコトランスフェクションすることを特徴とする請求項 7 に記載の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 10】

リコンビナーゼを発現する細胞がアデノウイルス E1 領域蛋白質を発現する細胞にリコンビナーゼを発現させたものである請求項 9 に記載の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 11】

治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドのリコンビナーゼ認識配列が増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドのリコンビナーゼ認識配列以外のものである請求項 6 ～請求項 10 のいずれかに記載の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 12】

増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの薬剤耐性遺伝子と治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの薬剤耐性遺伝子が異なり、また、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの Ori が R6K γ などの pir 遺伝子を発現するコンピテント細胞でしか複製できないものであることを特徴とする請求項 6 ～請求項 11 のいずれかに記載の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法。

【請求項 13】

請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミド。

【請求項 14】

請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる、増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドと、E1 領域を欠失したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドと、を含む作製用キット。

【請求項 15】

請求項 6 ～請求項 12 のいずれかに記載の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミド。

【請求項 16】

請求項 6 ～請求項 12 のいずれかに記載の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる、増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドと、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドと、少なくとも E1 A 領域を欠失したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドと、を含む作製用キット。

【請求項 17】

請求項 1 ～請求項 12 のいずれかに記載の方法により作製された増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを利用する悪性腫瘍等種々の疾患に対する治療法。

【書類名】明細書

【発明の名称】増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット

【技術分野】

【0001】

遺伝子治療やこれらの研究に用いることができる多因子により標的組織で特異的に増殖し、また、標的組織で特異的に治療遺伝子を導入できる増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを迅速かつ容易に作製できる方法及びその作製用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

現在、日本や先進国の死因の上位を占めるのは癌である。特に、癌の転移を完全に克服することは、既存の手術療法、化学療法、放射線療法では困難であるため、近年新しい治療法の研究、中でも遺伝子治療が期待され、その開発が進められてきている。そして、この基礎研究を基に、癌への遺伝子治療は、この約10年間で米国を中心に日本や他の先進国でも、臨床試験が数多く行なわれるようになり、その患者数も年々増えてきている。しかし、遺伝子治療のみで患者が完治したという報告は未だない。この最大の原因は、現在使用されている遺伝子導入ベクターの大部分は、安全性を確保するため、ウイルスの感染後は治療遺伝子を導入するだけでウイルス増殖を起こさないように遺伝子工学的に修飾された非増殖型ウイルスベクターだからである。非増殖型ウイルスベクターは安全である反面、培養細胞でのin vitro実験では優れた遺伝子導入効率を示しても、実際の臨床でのin vivo投与では、当然そのベクターを含む液体が浸透する領域以上には遺伝子が導入されない。非増殖型ベクターを使う以上、どうしても遺伝子が導入されていない癌細胞から癌が再発するという問題は克服できず、これが癌への遺伝子治療が臨床で期待された効果を得られていない最大の原因である。

【0003】

これを克服するアデノウイルスベクター（以下、ADVと略することがある）として、癌で高率に機能不全になっているp53機能欠損癌細胞でのみ特異的に増殖する、E1Bのある領域を欠損した変異型アデノウイルス(ADV)が報告されている（非特許文献1参照）。以降、このように癌特異的に限定されて増殖し、正常細胞では増殖しない増殖制御型ウイルスベクターの研究が進められてきた。例えば、アデノウイルスのE1A遺伝子を前立腺癌特異的なPSAプロモーターによって発現させることで前立腺癌特異的に増殖させようとする試みがある（非特許文献2参照）。

【0004】

しかし、現在までに報告されている増殖制御型ウイルスベクターは、癌を特異的に標的化するのにいずれも単一因子に依存した制御のみで、つまりその単一因子が癌細胞と正常細胞の発現の違いがあることにより、その因子に反応して癌細胞でのみウイルスが増殖するように工夫されたものである。しかし、癌と正常細胞は、ただか単一因子で違いを明確に規定できるものではないため、既存の増殖制御型ウイルスベクターは、いずれも癌を特異的に標的化するというのには程遠いものであった。これを可能にするには異なる性格を持つ多因子で同時に癌を特異標的化する必要があると思われるが、今までにそのような報告はない。また、これまでの増殖制御型ウイルスベクターは一つ一つ遺伝子組換えをおこない、一つ一つの増殖制御型ウイルスベクターを作製しなければならなかった。アデノウイルスは36kBという長いDNAウイルスであるため、それを含むプラスミドベクターの組み換えは、制限酵素の選択が限られるため、遺伝子組換えに制限が多く、効率良く行うことは不可能であった。このため、迅速に多量の増殖制御型アデノウイルスベクターを作ったり、改変したりすることは技術的に困難で、癌を特異的に標的化するベクターの探索に多数の増殖制御型ウイルスベクターを迅速に作製して検証するということは技術的に不可能であった。

【非特許文献1】Bischoff JR, et al. Science.1996 Oct 18 ; 274(5286): 373-376

【非特許文献2】Rodriguez , R . , et al , Cancer Res , 57 , 2559-2563 ,1997

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記事情に鑑みなされたのもであり、癌などの標的組織を完全に特異化して癌細胞などの標的組織でのみウイルスベクターが増殖するものを探索、作製するために、多因子で同時に癌などを特異標的化する増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを効率的で迅速かつ簡単に作製する方法及びその作製用キットを新たに提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために検討を重ね本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、上流から順に E1A 領域と、E1B 領域の少なくとも 1 の蛋白質コーディング領域又は全 E1B 領域と、ポリ A シグナル配列と、リコンビナーゼ認識配列とを有し、前記 E1A 領域の内因性プロモーターと E1B 領域の少なくとも 1 の蛋白質コーディング領域における蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節する内因性プロモーターをそれぞれ欠失させ、これらの欠失箇所にそれぞれ制限酵素認識配列を挿入して作製した増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの前記制限酵素認識配列に、標的組織で特異的に発現するプロモーターを各々導入して増殖制御型ベクタープラスミドを作製し、さらに、この増殖制御型ベクタープラスミドを E1 領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドに組み込み、増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製することを特徴とする増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法を要旨とする。ここで、標的組織における組織は、細胞をも含むものである。

【0007】

上記発明において、E1A 領域の Rb 蛋白結合配列を欠失させても良い。また、E1B 領域の蛋白質コーディング領域を 19 KDa 蛋白質コーディング領域及び／又は 55 KDa 蛋白質コーディング領域としても良い。E1A 領域の内因性プロモーターと E1B 領域の少なくとも 1 の蛋白質コーディング領域における蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節する内因性プロモーターの欠失箇所に挿入される制限酵素認識配列に、平滑末端となる制限酵素サイトをそれぞれ含ませても良い。リコンビナーゼ認識配列を LoxP 又は LoxH などその変異体配列としても良い。

【0008】

また、本発明は、上記の増殖制御型ベクタープラスミドと、上流から順にリコンビナーゼ認識配列と制限酵素認識配列を各々挿入して作製した治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの前記制限酵素認識配列に、恒常的強発現プロモーター又は治療遺伝子の発現プロモーターと治療遺伝子を上流から順に導入して作製した第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドとにリコンビナーゼを作用させて第 2 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを作製し、さらに、この第 2 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを E1 領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドに組み込み、治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製することを特徴とする治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法を要旨とする。

【0009】

また、本発明は、上記の増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと、上流から順にリコンビナーゼ認識配列と制限酵素認識配列を各々挿入して作製した治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの前記制限酵素認識配列に、恒常的強発現プロモーター又は治療遺伝子の発現プロモーターと治療遺伝子を上流から順に導入して作製された第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドとにリコンビナーゼを作用させ、治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製することを特徴とする治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの作製方法を要旨とする。

【0010】

上記の発明において、増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを混合してリコンビナーゼを作用させ、その後、両者を形質転換すること、あるいは増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドをリコンビナーゼを発現する細胞にコトランスフェクションすることで行っても良い。この発明において、リコンビナーゼを発現する細胞をアデノウイルスE1蛋白を発現する細胞にリコンビナーゼを発現させたものとしても良い。

【0011】

また、上記の発明において、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドのリコンビナーゼ認識配列を増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドのリコンビナーゼ認識配列以外のものとしても良い。さらに、上記の発明において、増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの薬剤耐性遺伝子と治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの薬剤耐性遺伝子が異なり、また、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドのOriがR6K γ などのpir遺伝子を発現するコンピテント細胞でしか複製できないものとしても良い。

【0012】

また、本発明は、上記の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドを要旨とする。この増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドにより、標的組織で特異的に発現する任意の2以上のプロモーターを各々制限酵素認識配列に導入して増殖制御型ベクタープラスミドを容易に作製でき、ひいては増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを容易に作製できる。

【0013】

また、本発明は、上記の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる、増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドと、E1A領域を欠失したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドとを含む作製用キットを要旨とする。この作製用キットにより、標的組織で特異的に発現する任意の2以上のプロモーターにより標的組織でのみ増殖する増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを容易に作製できる。

【0014】

また、本発明は、上記の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドを要旨とする。この治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドにより、標的組織で発現する任意の治療遺伝子を制限酵素認識配列に導入して第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを容易に作製でき、ひいては増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを容易に作製できる。

【0015】

また、本発明は、上記の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法に用いる、増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドと、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドと、少なくともE1A領域を欠失したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドと、を含む作製用キットを要旨とする。この作製用キットにより、標的組織で特異的に発現する任意の2以上のプロモーターと標的組織で発現する任意の治療遺伝子をと備え、標的組織でのみ増殖する増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを容易に作製できる。

【0016】

また、本発明は、上記のいずれかの方法により作製された増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを利用する悪性腫瘍等種々の疾患に対する治療法を要旨とする。

【発明の効果】

【0017】

本発明の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法によれば、標的組織でのみ発現するプロモーターをアデノウイルスに簡単に挿入できるので、標的組織以外での増殖を制御し、組織特異的な多因子により標的組織でのみ特異的に増殖して、癌細胞などの増殖を抑制できるアデノウイルスベクターを効率的かつ迅速に作製できる。

また、本発明の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法によれば、標的組織でのみ発現するプロモーターと治療遺伝子をアデノウイルスに簡単に挿入できるので、標的組織以外での増殖を制御し、組織特異的な多因子により標的組織でのみ特異的に増殖して、癌細胞などの増殖を抑制し、また、標的組織のみに選択的に治療遺伝子を導入し、発現できる。

したがって、本発明は、多因子で特異化される種々の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを自由に効率良く迅速に作製できることにより、真に癌細胞のみを特異標的化できるアデノウイルスベクターを簡単に作製し、解析できるとともに、癌と正常細胞の違いは何かという癌の根幹的な問題に取り組む生物学的研究、癌の基礎研究一般に広く応用できる。

また、本発明の作製用キットによれば、標的細胞でのみ発現する任意のプロモーターが組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの作製あるいは任意の治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの作製を容易に行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明に用いるアデノウイルスは、ヒトアデノウイルス5型、ヒトアデノウイルス2型、その他の型のヒトアデノウイルスをはじめ、他の動物種のアデノウイルスなどを用いることもできる。

【0019】

増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドは、以下のように遺伝子工学における一般的方法を用いて作製できる。

すなわち、内因性のプロモーターを含まないポリAシグナル配列を含むE1A領域をアデノウイルスの少なくとも5'側のゲノムを含むプラスミドを鋳型としてPCR法により増幅し、得られたPCR産物とクローニングベクターを制限酵素で消化した後、ライゲーションしてクローニングベクターに組み込み、p Δ Pr.E1A（以下、Prはプロモーター）を得る。PCRのセンスプライマーとアンチアンチセンスプライマーには、任意の制限酵素認識配列が付加され、内因性のプロモーターの欠失箇所に任意の制限酵素認識配列を挿入する。なお、鋳型となるプラスミドは、アデノウイルスの少なくとも5'側のゲノムを含むかぎり特に限定はない。またクローニングベクターについても特に限定はない。

【0020】

次いで、上記と同様にアデノウイルスゲノムを含むプラスミドを鋳型として蛋白質コーディング領域における蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節する内因性のプロモーターを欠失したE1Bの少なくとも1の蛋白質コーディング領域をPCR法で増幅し、PCR産物と上記のp Δ Pr.E1Aを制限酵素で消化した後、ライゲーションしてp Δ Pr.E1Aに組み込み、p Δ Pr.E1A- Δ Pr.Xk Δ pA（以下、pAはポリAシグナル配列）を得る。Xkは、E1B領域のX55KDa、19KDaなどいくつかの蛋白質をコードしている少なくとも1の蛋白質コーディング領域である。

【0021】

ポリAシグナル配列を含むプラスミドを鋳型として上記と同様にPCR法で増幅し、得られたPCR産物と上記のp Δ Pr.E1A- Δ Pr.Xk Δ pAを制限酵素で消化した後、ライゲーションしてp Δ Pr.E1A- Δ Pr.Xk Δ pAに組み込み、p Δ Pr.E1A- Δ Pr.XKpAを得る。PCR法のプライマーにはリコンビナーゼ認識配列が付加され、ポリAシグナル配列の下流にリコンビナーゼ認識配列を挿入する。なお、ポリAシグナル配列を含むプラスミドに特に限定はない。

【0022】

このようにして得られる増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドp Δ Pr.E1A- Δ Pr.XKpAは、E1A領域の内因性のプロモーターとE1B領域の蛋白質コーディング領域における蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節する内因性のプロモーターを欠失し、これらの欠失箇所に制限酵素認識配列が挿入されるためのものである。制限酵素認識配列には、SnaBI、EcoRV、HaeIII、AluI、SmaIなど平滑末端に消化する制限酵素サイトを設けることが好

ましい。

【0023】

また、E1A内部のRb蛋白結合配列(923~947 bp、24bp)を欠失した変異型アデノウイルスは、腫瘍特異的にウイルス増殖を行なうという報告がある(Heise, C. et al, Nat Med. 2000; 6(10):1134-9)ので、E1A領域はRb蛋白結合配列を欠失させても良い。Rb蛋白結合配列を欠失したE1A Δ 24は、上記のE1A領域を上記のアデノウイルスの少なくとも5'側のゲノムを含むプラスミドを鋳型としてRb蛋白結合配列から設計したプライマーを用い、PCR法を利用する変異導入法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 8.5.7~8.5.9, 1999)で得られる。E1A Δ 24を上記の増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドp Δ Pr.E1A- Δ Pr.Xkpaを制限酵素で消化した後、ライゲーションしてRb蛋白結合配列を欠失した増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドp Δ Pr.E1A Δ 24- Δ Pr.Xkpaを得る。

【0024】

リコンビナーゼ認識配列は、特異的なDNA組換え酵素であるリコンビナーゼにより認識される塩基配列であり、そのリコンビナーゼにより二つのリコンビナーゼ認識配列で挟まれたDNA鎖の切断、置換、結合というDNAの組換え反応を生じる特異的な塩基配列をいう。

リコンビナーゼ発現遺伝子は、リコンビナーゼを発現する遺伝子で、リコンビナーゼ認識配列loxPまたはLoxHなどその他の変異体配列を認識するバクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCre(Sternberg et al. J. Mol. Biol. Vol. 150, 467-486 (1981))、リコンビナーゼ認識配列FRTを認識する酵母(Saccharomyces cerevisiae)由来のリコンビナーゼFLP(Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol. 260, 12313-12319 (1985))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR(Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol. 8, 955-962 (1988))を発現する遺伝子などを代表例として挙げることができるがこれらに限定されない。

【0025】

また、増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドのE1B領域をE1Bの全領域としたp Δ Pr.E1A- Δ Pr.E1BpAとしても良い。E1Bの塩基配列に基づき設計したプライマーを用い、上記のアデノウイルスの少なくとも5'側のゲノムを含むプラスミドを鋳型としてPCR法により増幅し、PCR産物を得る。このPCR産物と増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドp Δ Pr.E1A Δ 24- Δ Pr.Xkpaを制限酵素で消化した後、ライゲーションして、E1BxkとE1B全配列が入れ替わった増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドp Δ Pr.E1A- Δ Pr.E1BpAを得る。

【0026】

作製された増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドp Δ Pr.E1A- Δ Pr.Xkpaの内因性のプロモーターの各々欠失箇所に挿入された制限酵素認識配列には、組織特異的に発現するプロモーターを挿入して、増殖制御型ベクタープラスミドを作製できる。

標的組織に特異的に発現するプロモーターとは、標的組織が癌細胞であれば癌細胞でのみ特異的に発現するCEA(Carcinoembryonic antigen、癌胎児性抗原)プロモーター(Mol. Cell. Biol., 10(6), 2738-2748, 1990)、E2Fプロモーター(Neuman, E., et al, Mol. Cell. Biol., 14(10), 6607-6615, 1994)、OC(オステオカルシン)プロモーター(Morrison, NA., et al, Science, 246, 1158-1161, 1989)、悪性黒色腫、線維肉腫などに特異的なFLK-1プロモーター(Xie, B., et al, Br J Cancer, 81, 1335-1343, 1999)、肺癌などに特異的なVEGFプロモーター(Koshikawa, N., et al, Cancer Res., 60, 2936-2941, 2000)、小細胞肺癌などに特異的なc-Mycプロモーター(Kumagai, T., et al, Cancer Res., 354-358, 1996)、肺癌、卵巣癌などに特異的なSLPIプロモーター(Garver, RI, et al, Gene Ther., 1, 46-50, 1994)、前立腺に特異的なPSAプロモーター(Latham, JP, et al, Cancer Res., 60, 334-342, 2000)、悪性黒色腫などに特異的なTyrosinaseプロモーター(Vile, RG, et al, Cancer Res., 53, 962-967, 1993)、乳癌に特異的なAP-2プロモーター(Pandha, HS, et al, J Clin Oncol, 17, 2180-2189, 1999)、脳腫瘍をはじめ多くの癌に特異的なTERTプロモーター(Takakura M, et al, Cancer Res., 59, 551-557, 1999)などを例示できる。

【0027】

この増殖制御型ベクタープラスミドをE1領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するプラスミドに組み込み、組織特異的に発現する2つのプロモーター（多因子）により他の組織での増殖を制御し、標的組織でのみ増殖する増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製できる。作製された増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドは、アデノウイルスのE1領域タンパク質を恒常的に産生している細胞、例えばヒト胎児腎細胞由来の293細胞（Graham, FL, et al, J. Gen. Virol., 36(1): 59-74）にトランスフェクションし増殖できる。E1領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するプラスミドは、アデノウイルスの感染を規定しているファイバーを癌細胞に高率に発現しているリガンドに変更することによりアデノウイルスの癌細胞への特異的な標的化が可能となるため、E1領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するプラスミドのファイバーをこのようリガンドに変更させても良い。

【0028】

また、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドは、以下のように遺伝子工学における一般的方法を用いて作製できる。

LoxPまたはその変異体配列の下流に、恒常的強発現プロモーター又は治療遺伝子の発現を調節する発現プロモーター及び治療遺伝子を組み込むための制限酵素認識配列を有するプラスミドを作製する。

また、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの薬剤耐性遺伝子と増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの薬剤耐性遺伝子が同一の場合、両者が異なる薬剤耐性遺伝子になるようにいずれかを組み換え、また、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドのOriがR6K γ などのpir遺伝子を発現するコンピテント細胞でしか複製できないものとするにより、リコンビネーションで正しく組み換えられたプラスミドのみを効率的かつ容易に選択することが可能となる。

【0029】

作製された治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの制限酵素認識配列には、恒常的強発現プロモーター又は癌細胞などの標的組織を治療するための治療遺伝子の発現プロモーターとその治療遺伝子を上流から順に挿入して、第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを作製する。恒常的強発現プロモーターとは、治療遺伝子を初めとするほとんどの遺伝子を恒常的に強く発現させるプロモーターのことをいい、例えばCA（サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ β アクチンプロモーターのハイブリッドプロモーター）プロモーターやCMV（サイトメガロウイルス初期遺伝子エンハンサー・プロモーター）プロモーターなどをいう。治療遺伝子とは、疾病組織に導入されて発現することにより分子レベルで疾病を治療する遺伝子の中で、癌で例示すれば、P53遺伝子をはじめとする癌抑制遺伝子、IL-2をはじめとするサイトカイン遺伝子、HSV-tk遺伝子をはじめとする自殺遺伝子、Fasをはじめとするアポトーシス誘導遺伝子、アンチセンス遺伝子等を挙げることができる。また、治療遺伝子の発現プロモーターは、これらの治療遺伝子を調節するプロモーターである。

【0030】

上記の増殖制御型ベクタープラスミドと第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドとに、リコンビナーゼを作用させることで両者はリコンビネーションして、標的組織で特異的に発現するプロモーターと標的組織で発現する治療遺伝子が導入された第2の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを作製できる。この第2の治療遺伝子発現ベクタープラスミドをE1領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するプラスミドに組み込むことにより、治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製できる。

【0031】

また、上記の治療遺伝子が組み込まれていない増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと上記の第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを混合してリコンビナーゼを作用させ、両者をリコンビネーションして組み換えることで治療遺伝子が組み込まれた増殖

制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製できる。リコンビナーゼを増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドとに作用させ、その後、両者を形質転換することで治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製しても良い。

【0032】

上記で得られる治療遺伝子が組み込まれない増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミド又は治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを、アデノウイルスE1領域蛋白質を恒常的に産生している細胞、例えばヒト胎児腎細胞由来の293細胞等にトランスフェクションすることにより、増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを作製できる。

【0033】

また、上記の治療遺伝子が組み込まれていない増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと上記の第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドをリコンビナーゼを発現する細胞にコトランスフェクションさせることにより、増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製しても良い。この場合、リコンビナーゼを発現しかつアデノウイルスE1領域蛋白を発現する細胞、例えば293細胞等にリコンビナーゼを発現させた細胞にコトランスフェクションさせれば、直接的に治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを作製できる。

【0034】

上記で得られる治療遺伝子が組み込まれない増殖制御型組換えアデノウイルスベクター及び治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの増殖、採取、精製は、アデノウイルスのE1領域蛋白質を恒常的に産生している細胞、例えばヒト胎児腎細胞由来の293細胞等を用いるなどアデノウイルスベクターの一般的な取り扱いで行うことができる。

【0035】

次いで、本発明に係る増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法の原理を理解するため、癌細胞を標的化する場合を例に挙げその概略図を図1に基づき説明する。なお、図中、(1)は、E1Aの発現を調節するプロモーター、(2)はE1Bの発現を調節するプロモーター、(3)はRb蛋白結合ドメインの欠失、(4)はE1B55KDa及び／又はE1B19KDaの欠失、(5)は治療遺伝子の発現を調節するプロモーター、(6)は治療遺伝子、(7)はアデノウイルス構造蛋白遺伝子の改変をそれぞれ示している。

(1)(2)に癌細胞で特異的に発現する任意のプロモーターを自在に入れ変えることで、癌特異的な増殖制御ができる。E1Aはアデノウイルスの感染後にまず最初に転写される領域であり、これが転写されなければ、アデノウイルスの効率的なウイルス増殖は起こらない。そこで、従来の非増殖型アデノウイルスベクターは、このE1A領域の遺伝子を欠失させ、そこに目的の治療遺伝子を導入していた。一方、E1B領域は、55KDa、19KDaなどいくつかの蛋白質をコードするが、この領域もE1Aの転写後に早期に転写され、E1B領域の転写、活性化もまた、アデノウイルスの効率的なウイルス増殖に重要といわれている。そこで、このE1AとE1Bからウイルスの内因性のプロモーターを除き、その領域に制限酵素認識配列(マルチクロニングサイト)を挿入し、他のプロモーターを簡単に導入できるようにした。ここに癌細胞に特異的に高発現している2つの異なるプロモーターを簡単に入れ替えることで、アデノウイルスの増殖が癌特異的なものになる。

さらに、(3)のRb蛋白結合ドメインを欠失させること、あるいは(4)のE1B55KDa及び／又はE1B19KDaの領域を欠損させることにより、その機序は未だ科学的に完全には解明されていないものの癌特異的にアデノウイルスが増殖したという、別々の報告がある。(3)と(4)の有り無しのプラスミドを独立して用意することにより、(3)、(4)の因子についても簡単に(1)、(2)の因子と併せて、癌を特異標的化することができる。このようにまず4つの完全に独立した因子により、癌特異的な増殖制御を可能とする。

【0036】

一方、(5)と(6)にそれぞれ癌特異的なプロモーター、癌にのみ有意な効果を示す遺伝子

などを用いることにより、治療遺伝子の発現と効果という観点からさらに癌を特異標的化できる。

そして(7)はアデノウイルスゲノムを含むアデノウイルスプラスミドベクター中のファイバーをはじめとするアデノウイルスの構造蛋白をコードする遺伝子を簡単に変更できるようにしたものである。

【0037】

本発明の特徴は、増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミド、治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミド、E1A領域を欠失したアデノウイルスゲノムを含むプラスミドというように、3つの独立したプラスミドベクターを用いることで、目的の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの作製のための遺伝子組換えを非常に効率良くかつ自由に行うことができるようにしたことである。つまり、これらの3つのプラスミドは独立に組み替えて用意し、これらが簡単に相互のプラスミドの組み換え、挿入が可能であり、それぞれの因子の組み合わせ、コンビネーションが自由に迅速におこなえるようになったことである。つまり以下のような工夫がすることにより、このことがより可能に行える。

(a) 一つのプラスミドに載せる複製開始点を特殊な大腸菌のみで働くものに変えて、さらに抗生剤耐性遺伝子の違いを利用して、目的の正しく組換えられたプラスミドの効率的な選択性が可能である。(b) リコンビネーション反応を利用して、遺伝子組換え過程の大腸菌内、あるいはアデノウイルス作製時の293細胞内で、治療遺伝子をアデノウイルスベクターに簡単に載せ変えることができる。(c) 増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミド、あるいは組み換えられて増殖制御用ユニットと治療遺伝子発現用ユニットを含むプラスミドを、制限酵素サイトを使うことでライゲーションで自由にアデノウイルスゲノムを含むプラスミドへの挿入が可能となる。つまり、このようにして、3種類のそれぞれの目的のプラスミドの独自の組み換えが可能となり、それぞれの目的に応じて簡単に適切な組み合わせをした増殖制御型組換えアデノウイルスベクターが作製できる。また、完成したアデノウイルスベクタープラスミドの改変も簡単におこなえるようになった。なお、本発明のベクターは、シャトルベクターを用いることもできる。

【実施例】

【0038】

次に、本発明を実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0039】

実施例1 (アデノウイルスのE1領域を任意のプロモーターで発現させるための増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの作製)

アデノウイルスベクターの構築プラスミドベクターは、pHM5を用いた。pHM5は、SphI、PstI、HincII、XbaI、BamHI、KpnI、SacI、EcoRIの制限酵素認識配列を有するクローニングベクターで、Dr. Mark A Kay (Stanford University)から供与をうけた(詳細は、Human Gene Therapy, 10: 2013-2017, 1999)。ヒト5型アデノウイルスゲノム5'側配列を含むプラスミドpXC1はMicrobix (Tronto, Canada)より購入した。アデノウイルスゲノムのE1A蛋白のコーディング領域からポリアデニレーションシグナルまでを含み、内因性のプロモーターは含まない領域(474~1658 bp)、E1B19KDa蛋白のコーディング領域(1684~2285 bp)のみでその内因性のプロモーター及びポリアデニレーションシグナルは含まない領域は、それぞれpXC1を鋳型として、またBovine growth hormone polyadenylation signal sequence (BGHp: 牛成長因子ポリアデニレーションシグナル配列)はpRc/RSV (Invitrogen、カタログ番号A-150307)を鋳型として、図2に示したプライマーセットによりKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡、カタログ番号KOD-101)を用いたPCR法にて増幅し、クローニングした。なお、ここで用いたE1Aのセンスプライマー(S-E1A、配列番号1)にはSphI、NotI、SnaBI、MluI各制限酵素の認識配列、同アンチセンスプライマー(AS-E1A、配列番号2)にはSalI、AvrIIの認識配列、E1B19KDaのセンスプライマー(S-E1B19K、配列番号3)にはAvrII、SalI、NdeI、EcoRV、MfeI各制限酵素の認識配列、同アンチセンスプライマ

ー(AS-E1B19K、配列番号4)にはBamHIの認識配列、BGHpA用のセンスプライマー(S-BGHpA、配列番号5)にはBamHIの認識配列、同アンチセンスプライマー(AS-BGHpA、配列番号6)には34bpのLoxH配列とEcoRI認識配列がそれぞれ付加されている(各プライマーのシーケンスと各PCRの条件は図2を参照)。次に、上記で得たE1Aのコーディング領域のPCR産物とpHM5を、制限酵素SphI(宝酒造、カタログ番号1180A)とSalI(東洋紡、カタログ番号SAL-111)にて消化し、T4 DNAライゲース(宝酒造、カタログ番号6022)にてライゲーションを行ない、pHM5にE1Aのコーディング領域が組み込まれたプラスミドpΔPr.E1Aを作製した。

また、上記で得たE1B19Kのコーディング領域を含むPCR産物とpΔPr.E1Aを、SalI、BamHI(東洋紡、カタログ番号BAH-111)で消化し、T4 DNAライゲースでライゲーションを行ない、プラスミドpΔPr.E1A-ΔPr.19KΔpAを作製した。さらに、上記で得たPCR産物のBGHpAとpΔPr.E1A-ΔPr.19KΔpAを共にBamHI、EcoRI(東洋紡、カタログ番号ER0271)で消化し、ライゲーションを行ない、プラスミドpΔPr.E1A-ΔPr.19K-BGHpA(以下、BGHpAは省略し、pΔPr.E1A-ΔPr.19Kと表す)を作製した。クローニングにPCR法を用いたために起こり得る塩基配列の変異の可能性を除去するため、pΔPr.E1A-ΔPr.19KのDNA配列は、DNAシーケンサー(Applied Biosystems社、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)にて正しい配列であること、また目的のDNA構築が作製できていることを確認した。以降も、PCR法を用いてクローニングしたDNAは、必ず同様にDNAシーケンサーを用いて確認した。

【0040】

このようにして作製されたプラスミドpΔPr.E1A-ΔPr.19Kは、pHM5のバックグラウンドを持つプラスミドであり、その中に上流より、マルチクローニングサイトとしてSphI、NotI、SnaBI、MluIの各制限酵素の認識配列、E1A蛋白のコーディング領域、マルチクローニングサイトとしてSalI、NdeI、EcoRV、MfeIの各制限酵素の認識配列、E1B19KDa蛋白のコーディング領域、BGHpA、LoxH配列を含むものである。つまり、E1AとE1B19KDaの上流のマルチクローニングサイトを用いて、上流にプロモーターを自由に挿入することができる。

また、このE1AとE1B19KDaの上流のマルチクローニングサイトにはSnaBIとEcoRVという平滑断端となる制限酵素サイトをそれぞれ一つは用いているため、如何なる制限酵素で切り出してきたプロモーター配列でも、それを平滑断端処理した後にライゲーションすればこの増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドpΔPr.E1A-ΔPr.19Kに簡単に確実に組み込むことができる。

【0041】

Rb蛋白結合配列を欠損した変異型E1Aを作製するために、図3に示すpXC1を鋳型としたPCR法による変異導入法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 8.5.7~8.5.9, 1999)を以下のように行い、Rb蛋白結合配列に相当するpXC1の923~947 bpの領域を欠失させた。まず、1次PCRとして、E1Aクローニングに用いたE1A5'末端の配列にSphI、NotI、SnaBI、MluI各制限酵素の認識配列を付加したセンスプライマー(S-E1A、配列番号1)と、Rb結合配列直前10 bp(913~922 bp)と直後20 bp(947~966 bp)をもつアンチセンスプライマーAS-Δ24(配列番号8)でのPCR、またRb結合配列直前20 bp(903~922 bp)と直後10 bp(947~956 bp)をもつセンスプライマーS-Δ24(配列番号7)と、E1A3'末端に制限酵素SalIの認識配列を付加したアンチセンスプライマー(AS-E1A、配列番号2)でのPCRを行い、それぞれ475bp、726bpのPCR産物を得た。この両PCR産物を混合して鋳型とし、センスプライマーS-E1AとアンチセンスプライマーAS-E1Aで2次PCRを行うと、両者が結合した産物、つまりRb蛋白結合配列(24bp)を欠失したE1A(E1AΔ24とする)が得られた。プライマー配列と、PCR反応の条件は図4に記載した。このE1AΔ24をpΔPr.E1A-ΔPr.19Kに制限酵素SphIおよびSalI(東洋紡、カタログ番号SAL-111)にて消化、DNAライゲース(宝酒造、カタログ番号6022)にて挿入して野生型E1Aと入れ替え、これをpΔPr.E1AΔ24-ΔPr.19Kとした。このようにpΔPr.E1AΔ24-ΔPr.19Kは、pΔPr.E1A-ΔPr.19KからE1A内部のRb蛋白結合配列が除かれた以外の点では同様の塩基配列、構造を持つ増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドである。

【0042】

E1B遺伝子の19KDa蛋白の部分だけでなく、55KDaやその他の領域を含む全ての野生型の

アデノウイルスのE1B全配列を用いたシャトルベクターを以下の様に組み換えを行なった。まず、E1B内のKpnI認識配列より14bp上流～33bp上流までの20bp (pXC1の2015～2034bp) と同じ配列を持つセンスプライマー (S-E1B-2015、配列番号9) と、野生型E1Bのポリアダニレーションシグナル配列3' 末端から24bp (pXC1の4050～4073 bp) の配列にLoxH配列 (34bp) とEcoRI認識配列を付加したアンチセンスプライマー (AS-E1B-4073、配列番号10) を用い、pXC1を鋳型としてKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡、カタログ番号KOD-101) を用いたPCR法にて増幅し、E1Bの2015～4073bpをクローニングした。プライマー配列と、PCR反応の条件は図4に記載した。このPCR産物を、制限酵素KpnI (東洋紡、カタログ番号KPN-111) およびEcoRI (東洋紡、カタログ番号ECO-111) にて消化し、pΔPr. E1A-ΔPr. 19Kを同様にKpnIとEcoRI消化したものにDNAライゲース (宝酒造、カタログ番号6022) により挿入した。これでE1B19KとE1B全配列が入れ替わり、得られたプラスミドをpΔPr. E1A-ΔPr. E1Bとした。このように作製されたpΔPr. E1A-ΔPr. E1Bは、E1AとE1Bのそれぞれの全蛋白を用いる外部プロモーターで発現できるようにしたものであり、pΔPr. E1A-ΔPr. 19Kとは、E1B19KDaの部分がpΔPr. E1A-ΔPr. E1Bでは全E1Bのコーディング領域が用いられていること以外の点では同様の塩基配列、構造を持つプラスミドである。これと同様の方法で、E1A内のRb蛋白結合配列を欠損したpΔPr. E1AΔ24-ΔPr. 19Kから、E1B全配列を持つ増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドpΔPr. E1AΔ24-ΔPr. E1Bを得た。

【0043】

実施例2 (増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドへの任意のプロモーターの挿入、増殖制御型ベクタープラスミドの作製)

上記で作製した増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドへ、実際に任意の目的のプロモーターを挿入した幾つかの実験例を以下に記載する。

まずCMV (Cymomegalovirus) プロモーター (Boshart, M., et al, Cell, 41, 521-530, 1985, Nelson, J.A., et al, Mol. Cell. Biol., 7, 4125-4129, 1987) を、E1B19Kの上流に挿入したプラスミドを作製した。CMVプロモーターは、プラスミドpRc/CMV (Invitrogen、カタログ番号A-150307) を鋳型として、SalI認識サイトをつけたセンスプライマー (S-CMVp、配列番号11) とMfeI認識サイトをつけたアンチセンスプライマー (AS-CMVp、配列番号12) でPCRを行なった (各プライマーの配列とPCRの条件は図5に記載)。このPCR産物 (pRc/CMVの231～893) と、プラスミドのpΔPr. E1A-ΔPr. 19K、あるいはpΔPr. E1AΔ24-ΔPr. 19Kを、それぞれSalI (東洋紡、カタログ番号SAL-111) -MfeI (New England Biolabs、カタログ番号R0589S) で消化し、T4 DNAライゲースを用いてライゲーションを行ない、E1B19Kの上流にCMVプロモーターを挿入し、pΔPr. E1A-CMV-19K、pΔPr. E1AΔ24-CMV-19Kの各増殖制御型ベクタープラスミドを作製した。

【0044】

次にCEAプロモーターをpΔPr. E1A-CMV-19K、pΔPr. E1AΔ24-CMV-19KのE1Aの上流に挿入した。まずCEAプロモーターを持つアデノウイルスAxCEAprTK (理化学研究所DNAバンクより供与) $10\mu\text{l}$ (5.6×10^{10} pfu/ μl) を、10% SDS (Sodium dodecyl sulfate、和光純薬、カタログ番号199-07145) $10\mu\text{l}$ 、0.5M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid、和光純薬、カタログ番号311-90075) $8\mu\text{l}$ 、蒸留水 $170.75\mu\text{l}$ と混合してよく攪拌した。さらに、20% プロテイナーゼK (Roche Diagnostics GmbH、カタログ番号745725) $1.25\mu\text{l}$ を加えて 56°C 、2時間消化後、フェノール・クロロホルム精製およびエタノール沈殿した。

この操作により、AxCEAprTKのgenomic DNA $2\mu\text{g}$ が採取された。このDNAを鋳型として、CEAコーディング領域の開始コドンから424 bp上流～2 bp上流の部分 (Osaki, T., et al, Cancer Res, 54, 5258-5261) を制限酵素NotI認識配列をつけたセンスプライマー (S-CEAp、配列番号13) と、制限酵素MluI認識配列をつけたアンチセンスプライマー (AS-CEAp、配列番号14) でPCRを行い、増幅した (各プライマーの配列とPCRの条件は図5に記載)。このPCR産物をMluI (東洋紡、カタログ番号MLU-101) とNotI (東洋紡、カタログ番号NOT-111) で消化し、同様にMluIとNotIで消化されたpΔPr. E1A-CMV-19K、pΔPr. E1AΔ24-CMV-19KとT4 DNAリガーゼによりライゲーション反応を行ない、pCEA-E1A-CMV-19K、pCEA-E1AΔ24-CMV-19Kを作製した。このように作製されたpCEA-E1A-CMV-19K、pCEA-E1AΔ24-CMV-

19Kは、CEAプロモーターによりE1AあるいはE1AΔ24が発現され、CMVプロモーターによりE1B19Kが発現される、増殖制御型ベクタープラスミドである（図6-1、6-2参照）。

【0045】

次に、E2FプロモーターをE1AとE1B19Kの各プロモーターとして挿入したコンストラクトを作製した。E2Fプロモーターは、Dr. Fine, H. (National Cancer Institute, Bethesda, MD) より供与されたプラスミドpABS.4:E2F-GFPより、制限酵素SpeI（東洋紡、カタログ番号SPE-101）およびXhoI（東洋紡、カタログ番号XHO-101）で切り出し、T4 DNAポリメラーゼ（MBI社、カタログ番号EP0061）で平滑末端化した。前述のpΔPr.E1A-CMV-19K、pΔPr.E1AΔ24-CMV-19KをSalI消化、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化し、自己ライゲーション防止のためにCalf intestine alkaliphosphatase (CIP: 牛小腸アルカリフォスファターゼ、宝酒造、カタログ番号2250A)で脱リン酸化処理し、これと切り出したE2FプロモーターとをT4 DNAライゲースにてライゲーションを行ない、pE2F-E1A-CMV-19K、pE2F-E1AΔ24-CMV-19Kを作製した。このようにして作製したpE2F-E1A-CMV-19K、pE2F-E1AΔ24-CMV-19Kは、E2FプロモーターによりE1AあるいはE1AΔ24が発現され、CMVプロモーターによりE1B19Kが発現される、増殖制御型ベクタープラスミドである（図6-1、6-2参照）。

【0046】

同様の方法で、pCEA-E1A-CMV-19K、pCEA-E1AΔ24-CMV-19KのCMVプロモーター部をSalIとMfeIで消化して切り取り、残りのベクター部分をT4 DNAポリメラーゼ、CIPで処理した後、前述の切り出したE2FプロモーターとT4 DNAリガーゼでライゲーションを行ない、それぞれpCEA-E1A-E2F-19K、pCEA-E1AΔ24-E2F-19Kのプラスミドを作製した。このようにして作製したpCEA-E1A-E2F-19K、pCEA-E1AΔ24-E2F-19Kは、CEAプロモーターによりE1AあるいはE1AΔ24が発現され、E2FプロモーターによりE1B19Kが発現される、増殖制御型ベクタープラスミドである（図6-1、6-2参照）。

【0047】

次にOC（オステオカルシン）プロモーターをE1Aのプロモーターとして挿入したコンストラクトを作製した。まず、ヒト骨肉腫SaOS-2（東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより供与） 5×10^6 個をトリプシン処理して回収し、セパジーン（三光純薬、カタログ番号SG0025）を用いてSaOS-2の採取したDNAを鋳型として、転写開始点から834 bp上流～34bp下流の部分をExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造、カタログ番号RR001A）にてPCRを行い（図5にプライマーのシーケンスとPCRの条件を記載、S-OCp、配列番号15、AS-OCp、配列番号16）、868bpのPCR産物を得た。これを電気泳動、精製後、OCプロモーターとして、そのままTベクターのpGEM-T Easy (Promega、カタログ番号A1360) にT4 DNAリガーゼでライゲーションして挿入した。クローニングしたOCプロモーターはDNAシーケンサーにて正しい塩基配列であることを確認した後、NotI消化にてベクターより切り出し、T4 DNAポリメラーゼにて平滑末端化した。pΔPr.-E1A-CMV-19K、pΔPr.-E1AΔ24-CMV-19KをSalI消化、T4 DNAポリメラーゼにて平滑末端化し、さらにCIP処理し、前述のOCプロモーターをT4 DNAライゲースによるライゲーション反応にて挿入し、pOC-E1A-CMV-19K、pOC-E1AΔ24-CMV-19Kを作製した。このようにして作製したpOC-E1A-CMV-19K、pOC-E1AΔ24-CMV-19Kは、OCプロモーターによりE1AあるいはE1AΔ24が発現され、CMVプロモーターによりE1B19Kが発現される、増殖制御型ベクタープラスミドである（図6-1、6-2参照）。

【0048】

実施例3（治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドの作製）

治療遺伝子を前もって増殖制御型ベクタープラスミドに、あるいは後で組み換えを完成した増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドに、Creリコンビネーション反応を利用して自由に挿入できるプラスミドを作製した。LoxP配列を持ち、治療遺伝子およびそのプロモーターを組み込めるプラスミドを以下のようにして作製した。pUni/V5-HisC (Invitrogen, Carlsbad, CA, 製品番号 ET003-11) のKn（カナマイシン）耐性遺伝子をBglIII（東洋紡、カタログ番号BGL-211）とSmaI（東洋紡、カタログ番号SMA-111）で切り出し、T4 DNAポリメラーゼにて平滑末端化し、自己ライゲーションを防ぐためにCIP処理した。pBR322（東洋紡、カタログ番号DNA-003）よりTc（テトラサイクリン）耐性遺伝子をSspI（東

洋紡、カタログ番号SSP-101)とStyI(New England Biolabs、Beverly、MA、カタログ番号R0050S)にて消化した後、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化した。これを、上記のようにKn耐性遺伝子が除かれて平滑末端化されているpUni/V5-HisCにT4 DNAリガーゼを用いてライゲーションして挿入し、Kn耐性遺伝子をTc耐性遺伝子に入れ替えた治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミドpUni/V5-HisC-Tcを作製した(図7-1参照)。さらにこのpUni/V5-HisC-TcをXhoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼによる平滑末端化、CIPにて処理した。一方、先に記したように、プラスミドpRc/CMVを鋳型としてSalIサイトをつけたセンスプライマー(S-CMVp、配列番号11)とMfeIサイトをつけたアンチセンスプライマー(AS-CMVp、配列番号12)でPCRすることにより得たCMVプロモーター部を、SalI、MfeI酵素で切り出し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化したものと、上記の平滑末端化されたpUni/V5-HisC-TcとをT4 DNAリガーゼでライゲーション反応を行ない、pUni/V5-HisC-Tc-CMVを作製した。つまりpUni/V5-HisC-Tc-CMVは、pUni/V5-HisC-TcにCMVプロモーターを挿入したプラスミドであり、CMVプロモーターの下流に、発現させたい目的の治療遺伝子を、マルチクローニングサイトのAgeI、ApaI、StuIのいずれかを用いて、挿入することができる。そしてCMVプロモーターと、その下流に挿入された遺伝子は、Cre発現により、前項に記載したE1部を制御する増殖制御型ベクタープラスミドに挿入したり、あるいは最終的に完成した増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドにも治療目的遺伝子がCre発現により挿入したりできるものである。また、CMVプロモーターは、必要な時は、制限酵素のHincII-AgeIで切り出して、その部に組織特異的なプロモーターを挿入することも容易にできる(図7-1参照)。

【0049】

実施例4(第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドの作製)

この一例として、マーカー遺伝子となるEGFP(enhanced green fluorescent protein)をこれに挿入したベクタープラスミドを、以下のようにして作製した。まずpEGFP-C1(CLONTECH、カタログ番号6084-1)をBclI消化し、T4 DNAポリメラーゼにて平滑末端化した後、AgeI消化にてEGFPのcDNAを切り出した。一方、pUni/V5-HisC-Tc-CMVをApaI消化し、T4 DNAポリメラーゼにて平滑末端化した後、AgeIで消化して、これに上記の切り出したEGFPのcDNA断片をT4 DNAリガーゼでライゲーションして挿入し、pUni/V5-HisC-Tc-CMV-EGFPを得た。つまり、第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドpUni/V5-HisC-Tc-CMV-EGFPはCMVプロモーターからEGFPが発現できる発現ベクターであるとともに、E1部を制御する増殖制御型ベクタープラスミドや、最終的に完成した増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドに、Creリコンビネーション反応によりCMV-EGFP遺伝子が挿入できるものである(図7-1参照)。なお、EGFPは治療遺伝子ではないが、実験上の便宜のため治療遺伝子の代替えとして挿入したものである。

【0050】

実施例5(増殖制御型ベクタープラスミドと第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドのリコンビネーションによる組換え、第2の治療遺伝子発現ベクタープラスミドの作製)

増殖制御型ベクタープラスミド(種々のプロモーターでE1A、E1Bを発現する)と、第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミド(種々のプロモーターで治療用遺伝子を発現する)を、Creリコンビナーゼで容易にリコンビネーション(LoxP、LoxH配列を認識して2つのプラスミドが1つに繋がる反応)することができる。この例として以下の8種類の組み合わせの組み換えを行った。増殖制御型ベクタープラスミド(pCEA-E1A-CMV-19K、pCEA-E1A Δ 24-CMV-19K、pE2F-E1A-CMV-19K、pE2F-E1A Δ 24-CMV-19K、pCEA-E1A-E2F-19K、pCEA-E1A Δ 24-E2F-19K、pOC-E1A-CMV-19K、pOC-E1A Δ 24-CMV-19K)と第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミド(pUni/V5-HisC-Tc-CMV-EGFP)をそれぞれ100ngずつ、Creリコンビナーゼ

(Invitrogen、カタログ番号R100-10)と反応(37℃、20分間)させる。次いで、65℃、5分間処理してCreを不活化し、反応を停止した。この反応液をコンピテント細胞DH5 α (東洋紡、カタログ番号DNA-903)に形質転換し、テトラサイクリン(7.5 μ g/ml、和光純薬、カタログ番号205-08591)を含むLB(Luria-Bertani、nacalai tesque、カタログ番号2006-95)アガロースプレート上で培養する。増殖制御型ベクタープラスミドはKn耐性遺伝子

のためコロニーを形成できず、第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドもR6K γ という特殊なOri(大腸菌複製開始点)をもつためDH5 α ではコロニーを形成できない。これに対して、増殖制御型ベクタープラスミドと第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドがリコンビネーションして作製された第2の治療遺伝子発現ベクタープラスミドはpUC OriとTc^rの両者を持つため、コロニーを形成することができるという仕組みである(図7-2参照、図中、pPrA-E1A-PrB-E1BとpUni/V5-HisC-Tc-CMV-GENEのリコンビネーションにより作製されるものが第2の治療遺伝子発現ベクタープラスミドである)。当初、Invitrogen社より購入したCreリコンビナーゼ(Invitrogen、カタログ番号R100-10)を用いて上記の反応を行ったが、LBプレート上に大腸菌のコロニーが得られなかった。反応系が正しく働いているかを確認するためInvitrogen社の組み替えキット(Echo cloning system、カタログ番号ET401-30C)に付属しているプラスミドpUni/V5-HisCと、pcDNA4/HisMax-Eとを用いて同様の反応を行ったところ、5個以下のコロニーしか得られなかった。つまり、Creリコンビナーゼの活性が低いと考えられた。そこで、Cre遺伝子を発現するアデノウイルスベクターAxCANCre(理化学研究所DNAバンクより供与)を用いてCreリコンビナーゼの抽出を行った。まず、アデノウイルスによる遺伝子導入効率の高いヒト肝癌細胞であるHepG2細胞(東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより供与)10cm径培養皿1枚に30 MOI(多重感染度、1 MOI=1 plaque forming unit/cell)で感染、3日後にトリプシン(nacalai tesque、カタログ番号35555-54)処理にて細胞を剥がし、PBSにて洗浄後、Lysisバッファー(20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10%glycerol, 1%protease inhibitorcocktail (SIGMA、カタログ番号P2714)) 200 μ lにて溶解し、凍結と融解を3回繰り返したものをCreリコンビナーゼとして使用した。このCreを用いて反応させたところコロニーが得られ、しかも出現したコロニーはすべて陽性クローンであった。つまりAxCANCreを用いて抽出したCreはこの反応系に十分な活性を持つことが示された。この反応によって得られた第2の治療遺伝子発現ベクタープラスミドをそれぞれ、pCEA-E1A-CMV-19K/CMV-EGFP、pCEA-E1A Δ 24-CMV-19K/CMV-EGFP、pE2F-E1A-CMV-19K/CMV-EGFP、pE2F-E1A Δ 24-CMV-19K/CMV-EGFP、pCEA-E1A-E2F-19K/CMV-EGFP、pCEA-E1A Δ 24-E2F-19K/CMV-EGFP、pOC-E1A-CMV-19K/CMV-EGFP、pOC-E1A Δ 24-CMV-19K/CMV-EGFPとした。

【0051】

実施例6 (アデノウイルスゲノムへの組み換え、増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドの作製)

第2の治療遺伝子発現ベクタープラスミド(前述のCreリコンビネーション)と並行して、治療用遺伝子を持たない増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製してシステム、機能の解析を行った。アデノウイルスゲノム(E1領域342-3523 bp、E3領域の一部28133-30818 bpを欠失)をもつ30.3kbのプラスミドpAdHM4(Dr. Mark A. Kay, Stanford Universityから供与)は、欠失したE1の部分に外来遺伝子を挿入するための制限酵素I-CeuI、PI-SceI認識配列を持っている。pAdHM4をまず制限酵素I-CeuI(New England Biolabs、カタログ番号R0699S)で消化(0.2U/ μ gDNA, 37 $^{\circ}$ C, 1時間)、フェノール・クロロホルム精製後エタノール沈殿した。次にPI-SceI(New England Biolabs、カタログ番号R0696S)で消化し同様に精製した。pCEA-E1A-CMV-19K、pCEA-E1A Δ 24-CMV-19K、pE2F-E1A-CMV-19K、pE2F-E1A Δ 24-CMV-19K、pCEA-E1A-E2F-19K、pCEA-E1A Δ 24-E2F-19K、pOC-E1A-CMV-19K、pOC-E1A Δ 24-CMV-19KもそれぞれI-CeuI、PI-SceI消化し、pAdHM4にそれぞれT4 DNAリガーゼをもちいて挿入した。得られたプラスミドは必ずI-CeuI、PI-SceI消化して挿入遺伝子を確認した。こうして得られた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドをpAd.HM4-CEA-E1A-CMV-19K、pAd.HM4-CEA-E1A Δ 24-CMV-19K、pAd.HM4-E2F-E1A-CMV-19K、pAd.HM4-E2F-E1A Δ 24-CMV-19K、pAd.HM4-CEA-E1A-E2F-19K、pAd.HM4-CEA-E1A Δ 24-E2F-19K、pAd.HM4-OC-E1A-CMV-19K、pAd.HM4-OC-E1A Δ 24-CMV-19Kとした。これらのプラスミドはアデノウイルスゲノムのE1、E3以外の部分と、外来性のプロモーターでE1AおよびE1B19K領域を発現する部分をもつプラスミドである。

【0052】

実施例7 (293細胞へのトランスフェクション)

実施例 6 で得た増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドをヒト胎児腎細胞由来の 293細胞にトランスフェクションした。293細胞の培養液は非働化10%ウシ胎仔血清 (MBL 社、カタログ番号268-1) を含むDMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium、SIGMA、カタログ番号D5796) を用いた。トランスフェクションはリン酸カルシウム法 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 9.1.4~9.1.9, 1999) で、1.5mlのHEPES buffered saline (pH7.1) に上記アデノウイルスゲノムを含む直鎖状DNA 20 μ g、鮭精巢DNA (SIGMA、カタログ番号D-7656) 20 μ gの計40 μ gのDNAを加え、2.5M CaCl₂ 75 μ lを攪拌しながら滴下、室温で30分静置した後、293細胞に培養液を攪拌しながら滴下した。そのままCO₂インキュベータで4時間半静置後、 α -MEM (GIBCO BRL、カタログ番号12000-022) に10%非働化馬血清 (GIBCO BRL、カタログ番号26050-088) を加えたものと、1%アガロースゲルを等量ずつ混合した溶液を培養皿に重層し、固形培地で293細胞の培養を続けた。導入効率を評価するためpEGFP-C1を同じプロトコルでトランスフェクションし、48時間後に蛍光顕微鏡下に陽性細胞を計測したところ、毎回30%程度の細胞に遺伝子導入されていた。アデノウイルスが産生されると293細胞は細胞変性効果 (CPE: Cytopathic effect) によりプラークを形成する。

相同組換えによりアデノウイルスが産生される従来の方法では、その相同組換えの効率の低さゆえに多数の培養皿でのトランスフェクションや、高い遺伝子導入効率が必要とされたが、In vitroライゲーション法 (Mizuguchi, H., et al, Hum. Gene Ther., 10, 2013-2017, 1999) に基づく本発明の作製法では10cm培養皿で30個以上のプラークが出現し、30%の導入効率で充分である。

【0053】

実施例 8 (治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを迅速に組換えるための2つの変法)

1. 増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドと第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドに直接Creリコンビネーションして治療遺伝子を組換えるシステム

治療遺伝子を持たない増殖制御型ベクタープラスミド (たとえばpCEA-E1A-CMV-19K) をアデノウイルスベクタープラスミド (pAdHM4など) に組み換えた後、治療遺伝子のみを自由に組み入れることができれば、組み換えがより早く、簡便に、多種の組み合わせのADVを作製できる。このシステムを確立するために、まず1例としてpAd.HM4-CEA-E1A-CMV-19KとpUni/V5-HisC-Tc-CMV-EGFPを用いて組み換えを行った。この2つのプラスミドを各100ngずつ混合し、前述のように精製したCreリコンビナーゼを用いて反応 (37℃、20分間) させる。続いて65℃、5分間処理してCreを不活化し、反応を停止した。この反応液をコンピテント細胞DH5 α (東洋紡、カタログ番号DNA-903) に形質転換し、テトラサイクリン (7.5 μ g/ml, 和光純薬、カタログ番号205-08591) を含むLB (Luria-Bertani, nacalai tesque, カタログ番号20066-95) アガロースプレート上で培養する。翌日、プレートには5個のコロニーが出現した。このコロニーから得たプラスミドを解析すると、全てがリコンビネーションを起こしてCMV-EGFP遺伝子が挿入される治療遺伝子が組み込まれた増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドpAd.HM4-CEA-E1A-CMV-19K/CMV-EGFPであった。コロニー数が少ない原因としてはアデノウイルスベクタープラスミドが30kbと長いことや、抗生物質テトラサイクリンの影響などが考えられるが、今回の結果から治療用遺伝子が挿入される確率は100%であることから、最低1個のコロニーが得られればよいことになる。

【0054】

この変法により、E1AプロモーターとE1Bプロモーターを固定して、様々な治療遺伝子やそのプロモーターを入れて効果を比較する際、毎回シャトルベクターに治療遺伝子を入れてからアデノウイルスベクターに組み換える必要がなくなる。

【0055】

2. コトランスフェクションによる細胞内でのCreリコンビネーション

第1の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを、増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドpAd.HM4-CEA-E1A-CMV-19Kなどへ組み換えをせずに、Creを発現する細胞にコトランスフェクションすることで、細胞内で2つのプラスミドのリコンビネーションがおり、

治療遺伝子をもつアデノウイルスが得られる方法を確立した。恒常的にCreを発現させた293細胞に、pAd.HM4-CEA-E1A-CMV-19Kと、マーカーとしてのEGFP遺伝子を発現するpUni/V5-HisC-Tc-CMV-EGFPを20 μ gずつ燐酸カルシウム法でコトランスフェクションした。遺伝子導入効率を評価するために、EGFP遺伝子を発現するプラスミドpEGFP-C1を同じ方法でトランスフェクションし、4時間半後に培地を新しいものに交換、48時間後に細胞をトリプシン処理にて回収、蛍光顕微鏡下にてEGFP陽性細胞を計数したところ、陽性率(=遺伝子導入効率)は21%であった。プラークは6日後から出現し、12日後には完全なプラークが10個、14日後にプラークを10個採取した。これらのプラークのうち、CreリコンビネーションがおこってEGFPが組み込まれたADVによるものは、蛍光顕微鏡下で観察すると、プラーク全体でEGFPが陽性となっているのが観察される。今回、10個のプラークのうち1個のみがEGFPが陽性であったので、EGFPが組み込まれているADVが出現する確率は10%ということになる。なおこの実験系で、前述の通常のADV作成法よりプラークの出現数が少ないのは、ADVゲノムDNAを含むプラスミドを制限酵素PacIで消化して直鎖化すると、Creリコンビネーションがおこらないため、PacI消化を除いたことで、ADV生成の効率が低下したことが理由であると考えられる。このEGFP(+)のプラーク採取液と、EGFP(-)のプラーク採取液のうち3クローンの計4つを、24wellの293細胞に感染・増幅した。EGFP(+)クローンではwell全体の細胞がEGFP陽性となったのに対し、他のwellでは一部の細胞のみがEGFP陽性であった。3日後にすべてのクローンでCPEが出現したので、これを回収した。次のステップとして10cmディッシュの293細胞に感染したところ、EGFP(+)のクローンでも感染後1日で約50~60%の細胞のみがEGFP陽性で、2日目には全ての細胞がCPEとなったが、80%の細胞しかEGFP陽性でなかった。つまり、残り20%の細胞はEGFP遺伝子を持たないADVによってCPEとなっていることを意味しており、モノクローナルとして採取したプラークに、EGFP(-)のADVが混入していた可能性が考えられた。このADV液を精製するためには再び293細胞に感染してEGFP陽性となるプラークを採取すればよいと考えられる。

【0056】

以上より、このコトランスフェクションの方法で、Cre発現293細胞内で2つのプラスミドがリコンビネーションして挿入遺伝子(EGFP遺伝子)を持つADVが得られることが確認された。この方法は試験管内でCre反応させ、大腸菌に形質転換してプラスミドを得てからトランスフェクションする系に比べてより簡便で迅速な方法である。

【0057】

実施例9 (プラークからの増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの採取、増殖と精製)

p Ad.HM4-CEA-E1A-CMV-19Kのトランスフェクション後7日で12個のプラークが出現した。プラークの中心で完全に細胞が消失して培養皿の底が見える状態を「完全なプラーク形成」として、1,000 μ lのマイクロピペッターチップを切り、先端を太くしたものを用いてプラークを固形培地ごと採取し、800 μ lの培地に懸濁して-80℃で保存した。各ウイルスに対して10個ずつのプラークを採取した。

【0058】

次に、この液を37℃恒温槽にて融解、液体窒素にて凍結のサイクルを3回繰り返して細胞を破壊して得たアデノウイルス液600 μ lを、前日に24well培養プレートに1x10⁵個で播いた293細胞に感染させる。感染後は3日おきに200 μ lの培地を加え、ばらつきはあるが5~7日でCPEが出現する。CPE出現後、培地、細胞とも回収して-80℃で保存する。次にこの液800 μ l(全体の容量の80%)を同様に3回凍結・融解後、10cm培養皿で70~80%コンフルエントの293細胞に感染する。この段階では2~4日でCPEが出現し、培地と細胞を回収して-80℃で保存する。次の段階はこの液を同様に3回凍結・融解後、全体の容量の80%(通常8ml)を、15cm培養皿(6枚)に70~80%コンフルエントの293細胞に感染する。感染後2~3日でCPEが出現し、培地と細胞を回収して-80℃で保存する。最後はこの液を同様に3回凍結・融解後、全体の容量の80%(通常100ml)を、15cm培養皿40枚に70~80%コンフルエントの293細胞に感染する。ここでは通常2日でCPEが出現するので、培地と細胞を回収して1000回転/分で遠心し、上清を除去して50mlの細胞浮遊液当たり1.5mlのPBS(リン酸緩衝

生理食塩水)にて懸濁し、40枚分を24mlの細胞浮遊液として-80℃で保存する。(この時すべての上清を捨てずに45mlの上清液を1本、保存しておく、この液を用いて15cm培養皿40枚に感染することで増幅が可能となる。)細胞浮遊液を3回凍結・融解後、1,000回転/分で遠心して上清を採取、日立超遠心用チューブ(日立工機、カタログ番号S303276A)に塩化セシウム(和光純薬、カタログ番号039-01955)密度勾配液(1.5g/ml CsCl 0.5ml, 1.35g/ml CsCl 3ml, 1.25g/ml CsCl 3mlを重層)を4本作製してそこにウイルス液を6mlずつ入れる。PBSで厳密にバランスを取ったあと、冷却高速遠心機(日立工機、himac CP6 5β)でスイングローター(日立工機、RPS40T)を用いてまず10℃、35,000回転/分、1時間遠心する。通常3本のバンドが見えるが、一番下層の青白いバンドがアデノウイルスであるので、まず慎重に上清を除去してからこの層を1ml(最高1.5ml)の容量で採取する。4本合計で約4ml(最高6ml)のウイルス液が得られる。次に1.35g/ml CsCl 6mlを入れた遠心チューブにこのウイルス液を入れ、バランス用のチューブも同様に1.35g/ml CsClで厳密にバランスを取り、10℃、35,000回転/分、18時間超遠心分離する。これでウイルスは1本のバンドとして現れ、上清を除いたあと、1~2mlの容量で残さずウイルス液を採取する。

【0059】

この後、以下の要領で脱塩カラムにて精製した。脱塩カラム(Biorad、Econopac 10DG、製品番号732-2011)の内容液を捨ててPBS 15mlを入れて全て滴下させる。ここにウイルス液Xmlを加える。カラムから溶出する液を1mlずつ番号(1番~7番)をつけた1.5mlマイクロチューブに採取する。次にカラムにPBSを(3-X)ml加え、同様に1mlずつ採取する。さらに4mlのPBSを加えて、同様に1mlずつ採取する。これで1~7番まで計7本が得られるが、4番のチューブに濃縮されたウイルスの大部分が含まれている。念のため全てのチューブのADVの濃度を以下の方法で測定する。PBS 94μl、10% SDS 5μl、ウイルス液1μlを混合し、ボルテックス(SCIENTIFIC INDUSTRIES, Inc., BOHEMIA, NY)でよく攪拌し、ウイルスの外殻を破壊する。これを15,000rpm、3min遠心して上清を採取して、OD_{260nm}を測定する。1 OD_{260nm} = 1x10¹² particle/ml (20倍希釈液では1 OD_{260nm} = 2x10¹³ particle/ml)としてウイルス液の濃度を計算する。通常、15cm培養皿40枚で増幅した場合、1~5x10¹² particle/mlの濃度で1.5~2mlのウイルス液が得られた。

【0060】

精製後のADV液は、10%Glycerol(和光純薬、カタログ番号075-00616)を加えて分注、-80℃で保存した。こうしてAd.CEA-E1A-CMV-19K及び同様の方法で、Ad.CEA-E1AΔ24-CMV-19K、Ad.E2F-E1A-CMV-19K、Ad.E2F-E1AΔ24-CMV-19K、Ad.CEA-E1A-E2F-19K、Ad.CEA-E1AΔ24-E2F-19K、Ad.OC-E1A-CMV-19K、Ad.OC-E1AΔ24-CMV-19Kの8種類のアデノウイルスを得た。

【0061】

実施例10(作製した増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの増殖確認)

一例として、Ad.CEA-E1A-CMV-19KのCEAプロモーター依存性の増殖を確認する実験を行った。CEA発現大腸癌細胞株colo-205、Lovo、HCT-15細胞(東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより供与)とCEAを発現しないHela細胞、陽性コントロールとして全てのアデノウイルスが増殖する293細胞にそれぞれ、Ad.CEA-E1A-CMV-19KをMOI 100、10、1、0.1、0.01、0にて感染してCPEの出現を観察した。感染後2日目でMOI 100のwellでは全ての細胞で細胞毒性が強く出現していた。これに対して非増殖型(E1欠損)のADVであるAd.CMV-LacZを感染させたwellではMOI 100でも細胞毒性は軽度しか見られず、CEA発現大腸癌細胞株ではすでにウイルスの増殖が始まっていると考えられた。感染7日後にはLovoと293ではMOI 1までCPE、HCT-15ではMOI 10までCPE、colo-205ではMOI 100で軽度の細胞毒性、HelaではMOI 100のみCPEが見られ、Lovoは293と同程度にADVが増殖、HCT-15もそれに次ぐ程度の増殖が見られ、colo-205とHelaではあきらかなADVの増殖はないと考えられた。最終的には、感染後2週間でLovoはMOI 0.1まで、HCT-15はMOI 1まで、293ではMOI 0.01まで細胞障害が見られ、ADVの増殖の程度をあらわしている。これに対し、colo-205ではMOI 100にても細胞障害は見られず、HelaではMOI 10まで細胞障害が見られたことは

、CEAプロモーターによりADVの増殖が制限されていることを表していると考えられる。しかし、CEA非産生癌のHelaで多少の細胞障害が見られたことがADVの増殖によるものか、Helaの感受性によるものかを判断するには、経時的にADVの増殖を評価できることが必要である。そこで、治療用遺伝子を組み込むベクターにマーカーとしてのEGFP遺伝子を組み込み、Ad.CEA-E1A-CMV-19K/CMV-EGFPを作製した。このADVは細胞に感染後、EGFPの陽性率を観察することでADVの増殖を知ることができる。下記の表1は、増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの感染12日後の増殖能を細胞死（CPE）で示すグラフである。なお、intactは、不変（傷害なし）の意で、下記表2及び表3も同様である。

【0062】

【表1】

MOI	100	10	1	0.1	0.01	0
Lovo	CPE	CPE	CPE	細胞傷害	intact	intact
HCT-15	CPE	CPE	細胞傷害	intact	intact	intact
colo-205	intact	intact	intact	intact	intact	intact
293	CPE	CPE	CPE	CPE	細胞傷害	intact
Hela	CPE	細胞傷害	intact	intact	intact	intact

【0063】

実施例11（EGFPを発現する増殖制御型組換えアデノウイルスベクター）

Ad.CEA-E1A-CMV-19K/CMV-EGFPを前述のような方法で作製し、超遠心にて精製し、 2.0×10^{12} particle/mlの濃度で2mlのウイルス液を得た。CEA発現癌細胞MKN-1、MKN-28、MKN-45、HCT-15、Lovo、colo-205にMOI100、10、1、0.1、0.01、0で感染し、蛍光顕微鏡下でEGFP陽性率を観察しながら、細胞障害（CPE）の出現にてADVの増殖を評価した。感染後2日ではcolo-205以外はMOI 100ではほぼ100%の細胞がEGFP陽性であり、colo-205のみが50%程度の細胞のみがEGFP陽性であった。つまり、colo-205はADVによる遺伝子導入効率が低いことを意味している。時間の経過とともにEGFPの陽性率、CPEともに増強していったが、その傾向が強かったのはMKN-28、Lovo、HCT-15であった。1例としてMKN-28の結果を示すと、感染1日後にはMOI 1のwellは20%程度がEGFP陽性で細胞障害は全く見られなかったが、6日後にはEGFP陽性率が50%程度に増加し、8日後からは細胞障害（一部の細胞がCPEとなる）が出現し、12日後には80%以上の細胞が陽性となり、ほぼCPEに近い状態となった。つまり、EGFPというマーカー遺伝子で観察されるADVの増殖と、細胞の障害を表すCPEが相関して出現したことから、Ad.CEA-E1A-CMV-19K/CMV-EGFPがCEA産生癌で増殖し、その毒性により細胞を死滅させることができることが証明された。下記の表2及び表3は、それぞれ増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの感染12日後の増殖能をEGFPの陽性率で示すグラフ及び感染12日後の増殖能を細胞死（CPE）で示すグラフである。

【0064】

【表 2】

MOI	100	10	1	0.1	0.01	0
MKN-1	100%	100%	30%	5%以下	1%以下	0
MKN-28	100%	100%	100%	20%	1%以下	0
MKN-45	100%	100%	80%	30%	5%以下	0
HCT-15	100%	100%	100%	80%	20%	0
LOVO	100%	100%	100%	100%	10%	0
colo-205	50%	30%	10%以下	1%以下	1%以下	0
293	100%	100%	100%	100%	100%	0

【0065】

【表 3】

MOI	100	10	1	0.1	0.01	0
MKN-1	CPE	細胞傷害	intact	intact	intact	intact
MKN-28	CPE	CPE	CPE	細胞傷害	intact	intact
MKN-45	CPE	CPE	intact	intact	intact	intact
HCT-15	CPE	CPE	CPE	細胞傷害	intact	intact
LOVO	CPE	CPE	CPE	CPE	intact	intact
colo-205	細胞傷害	intact	intact	intact	intact	intact
293	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	intact

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図 1】本発明の増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法の原理を示す概略図である。

【図 2】実施例 1 の増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの作製に用いた PCR プライマー及び PCR 反応の条件を示す。

【図 3】実施例 1 の Rb 蛋白結合配列を欠損した増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドを作製するための変異導入法の原理を示す説明図である。

【図 4】実施例 1 の Rb 蛋白結合配列を欠損した増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミド及び E1B の全領域を有する増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの作製に各々用いた PCR プライマー及び PCR 反応の条件を示す。

【図 5】実施例 2 の増殖制御用ベクタープラスミドの作製に用いた PCR プライマー及び PCR 反応の条件を示す。

【図 6-1】実施例 2 で作製された Rb 蛋白結合部位を欠失しない増殖制御型ベクタープラスミドを示す。

【図 6-2】実施例 2 で作製された Rb 蛋白結合部位を欠失した増殖制御型ベクタープラスミドを示す。

【図 7-1】実施例 3 で作製された治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミド及び実施例 4 で作製された第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドを示す。

【図 7-2】実施例 5 の第 2 の治療遺伝子発現ベクタープラスミドがリコンビネーションにより作製される工程を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

<120> Efficient methods and kits for constructing conditionally replicating adenoviral vectors

<130> PTL11

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kosai, Kenichiro

Inventor: Nagano, Satoshi

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 1

tcagtcgcat gcgcggccgc tacgtaacgc gttacccggt gagttcctca agaggc 56

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 2

ggacgtccta gggctgcacgc cccatttaac acgccatgca ag 42

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 3
tcagtccta gggtcgacca tatggatata caattgcgtg ggctaatttt ggttacatct 60

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 4
ggacgtggat ccgcgtctca gttctggata cagttc 36

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 5
tcagtcggat ccgcatgcat ctagagctcg ctgata 36

<210> 6
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 6
ggacgtgaat tcataacttc gtataatgta tgctatatga ggtaattcag aagccataga 60
gcccaccgca 70

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 7
ttgtaccgga ggtgatcgat ccacccagt

29

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 8
tcctcgtcgt cactgggtgg atcgatcacc

30

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 9
ataaatggag cgaagaaacc

20

<210> 10
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 10
ggacgtgaat tcataacttc gtataatgta tgctatatga ggtaatcttg atccaaatcc

60

aaacagagtc

70

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 11
tcagtcgtcg accgttgaca ttgattattg ac 32

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 12
ggacgtcaat tggcttgggt ctccctatag tg 32

<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 13
tcagtcgcgg ccgcatcatc ccaccttccc agag 34

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 14
ggacgtacgc gtccaggtct ctgctgtctg c 31

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 15
ctgcagggtc aggaggagaa 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

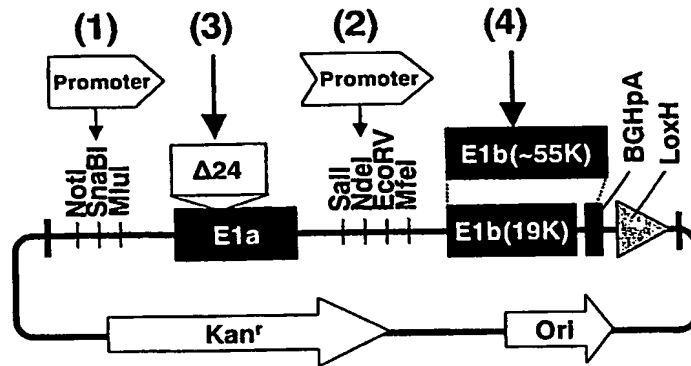
<220>
<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 16
gcgctgggct gctgctcagg

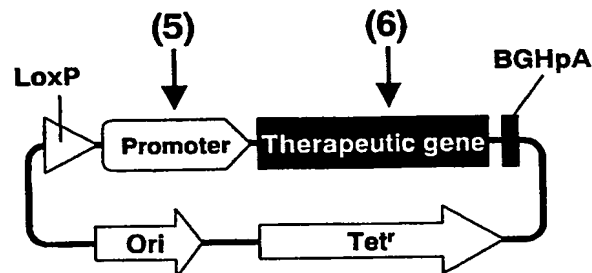
20

【書類名】図面

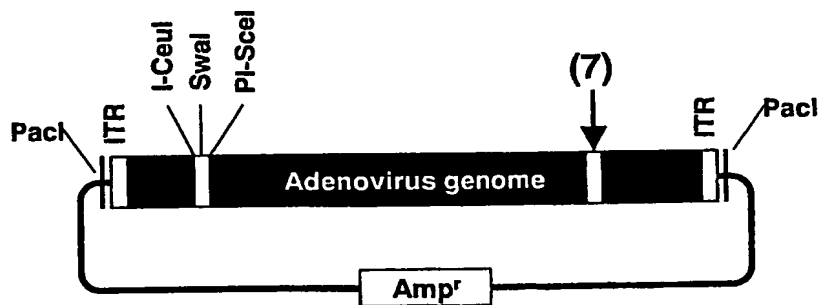
【図 1】



A. 増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミド



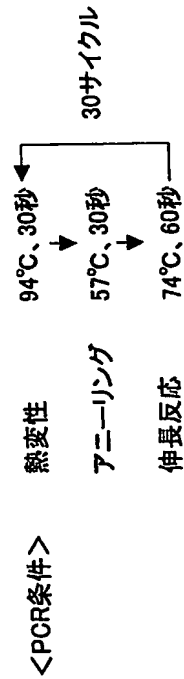
B. 治療遺伝子発現用ユニットを含むベクタープラスミド



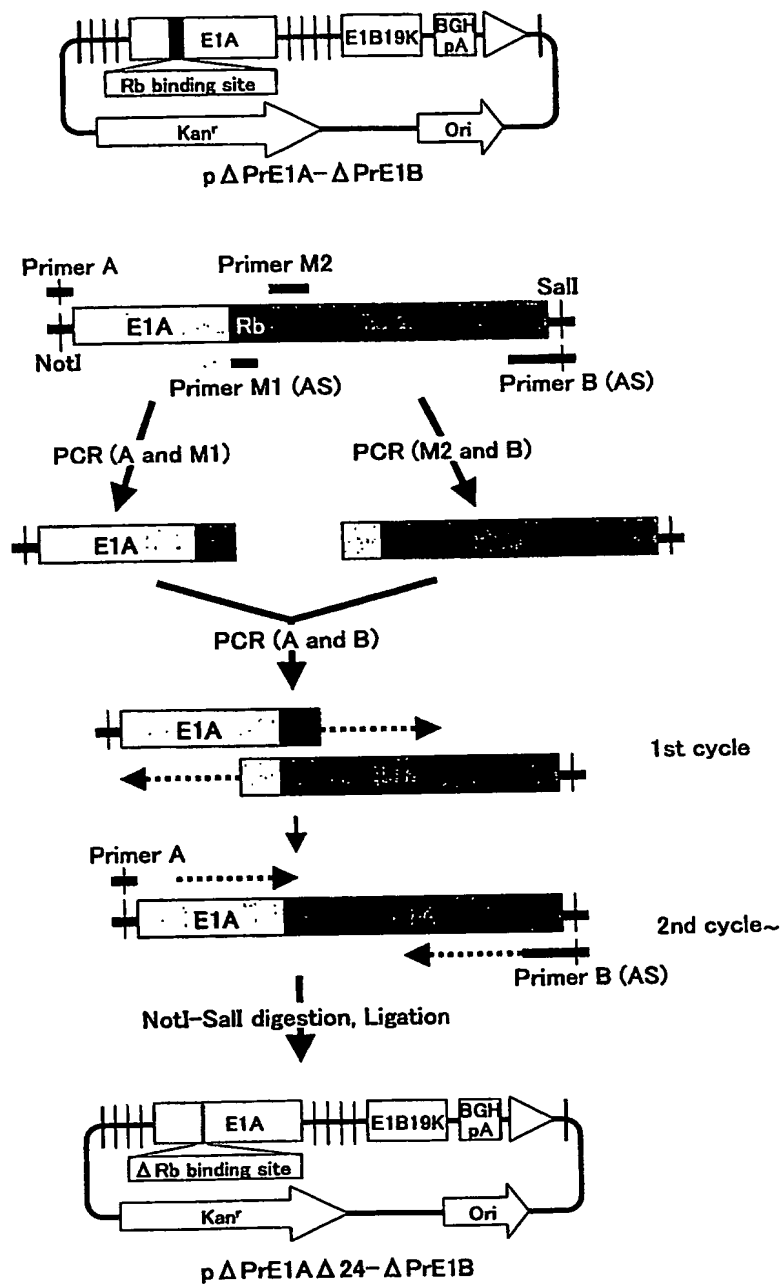
C. アデノウイルスベクタープラスミド

【図 2】

プライマー名	DNA配列
S-E1A	5'-TCAGTCGCATGCGCGCGCTACGTAACGGTTACCGGTGAGTTCCTCAAGAGGC-3' Stuffer SphI NotI SnaBI MluI Ad5 474~497
AS-E1A	5'-GGACGTCCTAGGTGCGACGCCCATTTAACACGCCCATGCAAG-3' Stuffer AvrII SalI Ad5 1635~1658 (AS)
S-E1B19K	5'-TCAGTCCCTAGGTGACCATATGGATATCCAAATTGCGTGGGCTAATCTTGGTTACATCT-3' Stuffer AvrII SalI NdeI EcoRV MfeI Ad5 1684~1707
AS-E1B19K	5'-GGACGTGGATCCGCGTCTCAGTTCCTGGATACAGTTC-3' Stuffer BamHI Ad5 2262~2285 (AS)
S-BGHpA	5'-TCAGTCGGATCCGCGCATGCATCTAGAGCTCGCTGATC-3' Stuffer BamHI pRc/RSV 693~716
AS-BGHpA	5'-GGACGTGAATTCATAACTTCGTATAATGTATGCTATATGAGGTAATTCAGAAGCCATAGAGCCACCGCA-3' Stuffer EcoRI LoxH (AS) pRc/RSV 933~956 (AS)

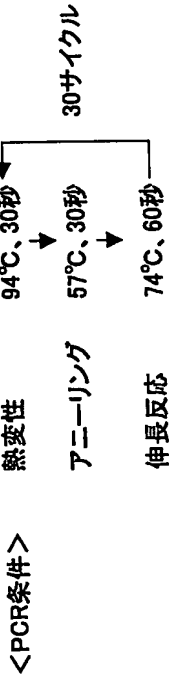


【図 3】



【図 4】

プライマー名	DNA配列
S-Δ24	5'-TTGTACCGGAGGTGATCGATCCACCCAGT-3' Ad5 903~922 Ad5 947~956
AS-Δ24	5'-TCCTCGTCGTCACCTGGGTGGATCGATCACC-3' Ad5 966~947 (AS) Ad5 922~913 (AS)
S-E1B-2015	5' ATAAATGGAGCGAAGAAACC 3' Ad5 2015~2034
AS-E1B-4073	5' GGACGTGAATTCATAAAGTTCGTATAATGTATGCTATATGAGGTAATCTTGATCCAAATCCAAACAGAGTC 3' Stuffer EcoRI LoxH (AS) Ad5 4050~4073 (AS)



【図 5】

プライマー名	DNA配列
S-CMVp	5'-TCAGTCGTCGACCGTTGACATTGATTATTGAC-3' Stuffer SalI pRc/CMV 231~250
AS-CMVp	5'-GGACGTCAATTGGCTTGGGTCTCCCTATAGTG-3' Stuffer MfeI pRc/CMV 874~893 (AS)
S-CEAp	5'-TCAGTCGGCGCGCATCATCCACGTTCCACAGAG-3' Stuffer NotI CEAp (-424~-405)
AS-CEAp	5'-GGACGTACGCGTCCAGGTCTCTGCTGCTGTCGC-3' Stuffer MluI CEAp (AS, -19~+1)
S-OCp	5'-CTGCAGGGTCAGGAGAGAA-3' OCp (-834~-815)
AS-OCp	5'-GCGCTGGGCTGCTGCTCAGG-3' OCp (+12~+31)

<PCR条件>

熱変性94℃、30秒

↓

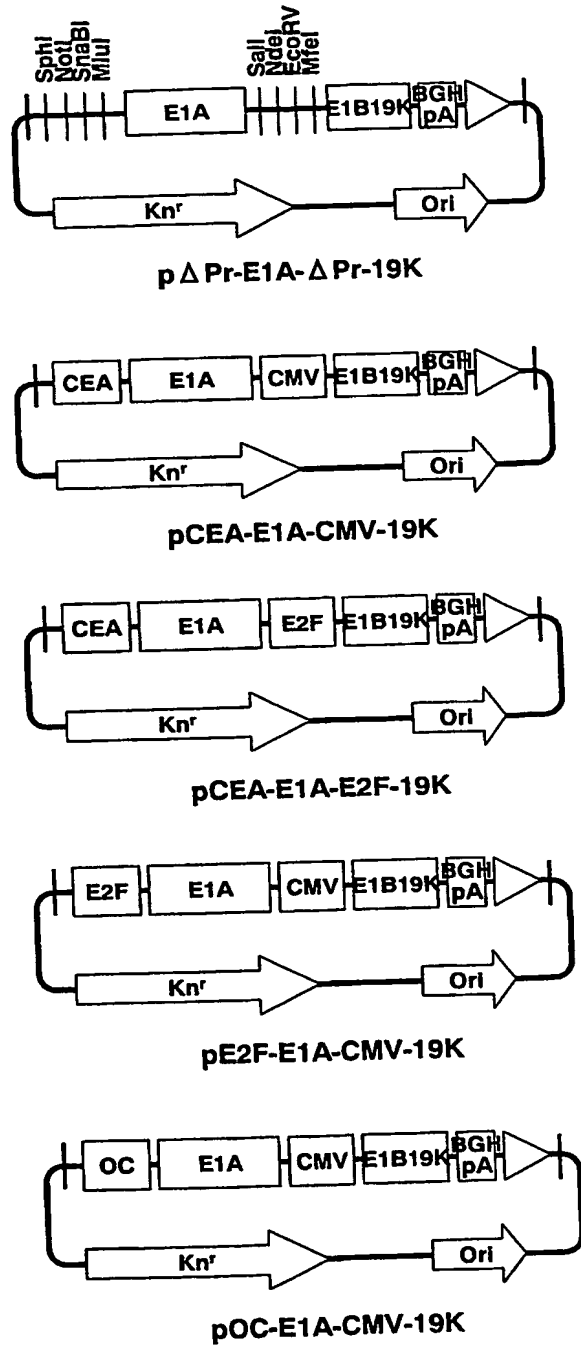
アニーリング57℃、30秒

↓

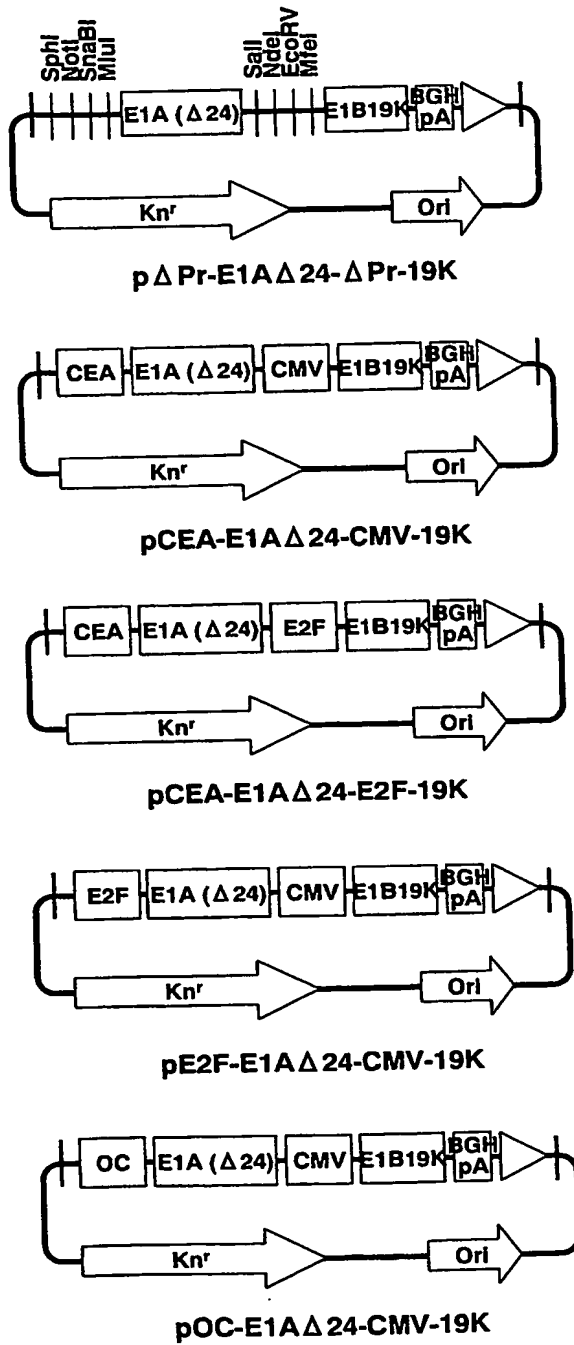
伸長反応74℃、60秒

30サイクル

【図 6-1】

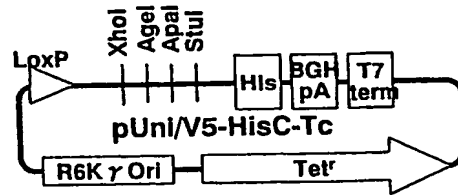


【図 6-2】

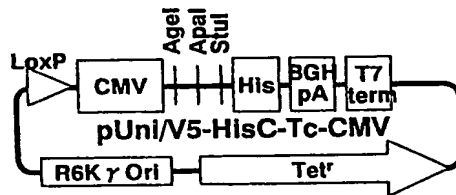


【図 7-1】

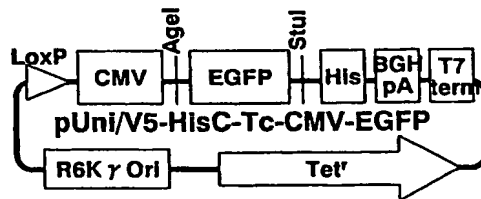
治療遺伝子発現用ユニットを含む
ベクタープラスミド



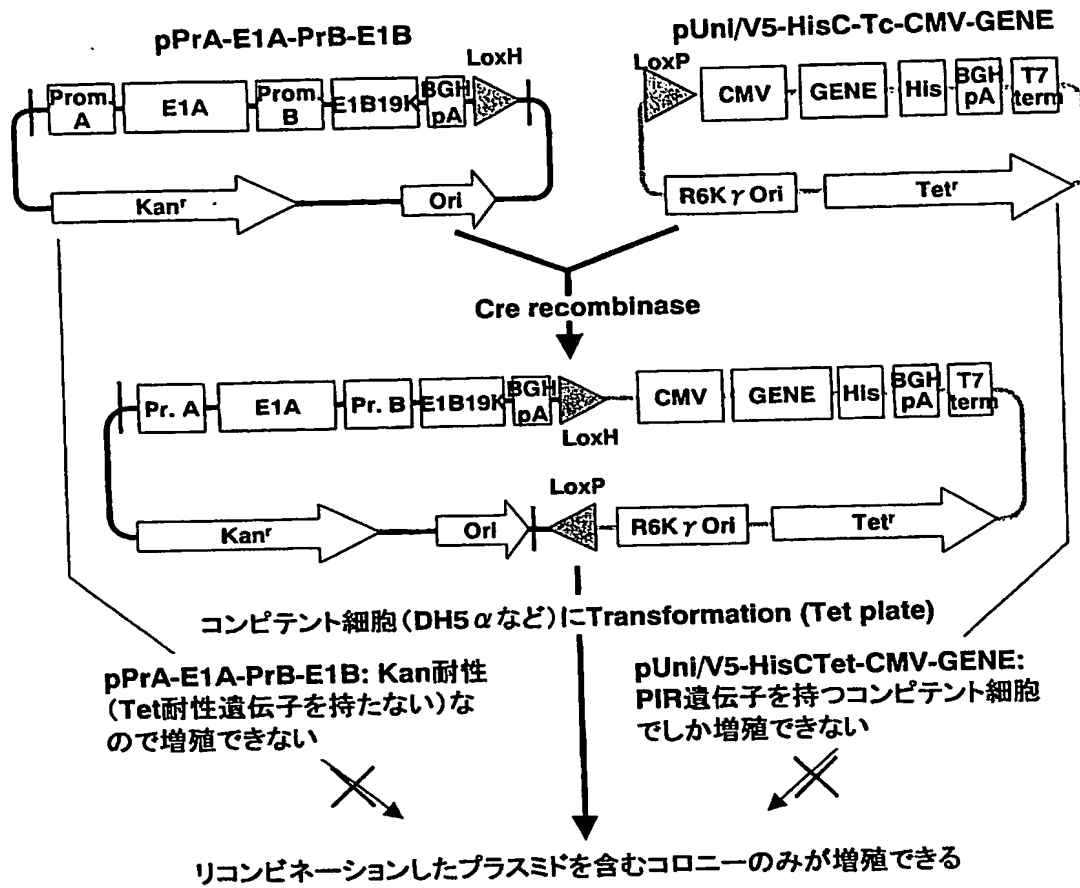
第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミド
(恒常的強発現プロモーターのみ組み込んだもの)



第 1 の治療遺伝子発現ベクタープラスミド



【図 7-2】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 多因子で同時に癌などを特異標的化する増殖制御型組換えアデノウイルスベクターを効率的に作製する方法及びその作製用キットを提供すること。

【解決手段】 上流から順に E1A 領域と、E1B 領域の 1 の蛋白質コーディング領域と、ポリ A シグナル配列と、リコンビナーゼ認識配列とを有し、E1A 領域の内因性プロモーターと E1B 領域の 1 の蛋白質コーディング領域における蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節する内因性プロモーターとを欠失させ、該欠失箇所に制限酵素認識配列を挿入して作製した増殖制御用ユニットを含むベクタープラスミドの制限酵素認識配列に、標的組織で特異的に発現するプロモーターを導入して増殖制御型ベクタープラスミドを作製し、該増殖制御型ベクタープラスミドを E1 領域を欠失させて作製したアデノウイルスゲノムを有するベクタープラスミドに組み込み、増殖制御型アデノウイルスベクタープラスミドを作製する。

【選択図】 図 1

特願 2003-283427

出願人履歴情報

識別番号

[598091860]

1. 変更年月日

1998年 7月 9日

[変更理由]

新規登録

住所

愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号

氏名

財団法人名古屋産業科学研究所